

Analytische Einblicke auf der molekularen Ebene

Von Sandra Grotefend, Hermann Wätzig, Braunschweig und Klaus Raith, Magdeburg

Die Tagung fand als Vorsymposium zur Jahrestagung der Österreichischen und der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (ÖPhG & DPhG) am 20. und 21. September in Innsbruck statt. Die Veranstaltung wurde von den Vorsitzenden der Fachgruppe, Prof. Dr. Hermann Wätzig und PD Dr. Klaus Raith, organisiert und durch AZ Biopharm, AB SCIEX, A&M Stabtest, Bene Arzneimittel, Bruker, Vetter Pharma, Schaper & Brümmer, das Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM) und die Fraunhofer-Gesellschaft unterstützt.

Die Fachgruppentagung bot ein breites und abwechslungsreiches Themenspektrum unter dem Titel **Analytik auf der molekularen Ebene**. Das Spektrum reichte von apparativen Entwicklungen und neuen bioinformatischen Tools über die biochemische Forschung bis hin zu Anwendungsbeispielen aus der behördlichen Arzneimittelüberwachung und der Gerichtsmedizin.

Mit seinem Vortrag über die „Strukturidentifizierung von Pharmaka mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden“ eröffnete Privatdozent Dr. Klaus Raith die diesjährige Tagung. Er gab einen Überblick über die Selektivität und Empfindlichkeit verschiedener eingesetzter Methoden und stellte ein Stufenschema vor, welches von der UV/Vis-Spektroskopie über die HPLC mit UV-Detektion zur MS/MS-Kopplung sowie der hochauflösenden Massenspektrometrie zunehmenden Informationsgehalt liefert. Eine wesentliche Ergänzung stellt die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) dar, welche die Unterscheidung von isobaren Verbindungen ermöglicht, was der MS naturgemäß verborgen bleibt. Somit können auch Unterschiede in der Molekülform für die Trennung ausgenutzt werden. In der Analytik der Biopharmazeutika ist die MS inzwischen ebenfalls unverzichtbar, auch wenn in der Qualitätskontrolle der Biologicals noch viele Fragen offen sind.

Dr. Reinhard Bogan vom Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr München berichtete über ein noch nicht beschriebenes Abbauprodukt von Pyridostigmin, welches im Rahmen von Untersuchungen zur Arzneimittelsicherheit von Notfallvorräten entdeckt wurde. Die Pyridostigmintabletten wurden 1988 als Schutz vor Angriffen mit Organophosphaten eingelagert. Bei der Überprüfung konnte ein Nebenpeak im Chromatogramm als Tetramethylharnstoff identifiziert werden. Ein plausibler Abbauweg aus dem Wirkstoff basierend auf Hydrolyse, Decarboxylierung und nachfolgender Säureamidbildung wurde dargestellt. Nachweis und Quantifizierung des Abbauproduktes erfolgte mittels HPLC-DAD sowie GC-MS. Auf Grundlage publizierter Daten zur Toxikologie des Abbauproduktes wurde abschließend eine Nutzen-Risiko-Bewertung des langzeitgelagerten Arzneimittels vorgenommen.

Der Einsatz von NIR- und Raman-Spektroskopie in der Qualitätskontrolle wurde von Daniel Glauser von der Schweizerischen Arzneimittelagentur Swissmedic in Bern vorgestellt. Für die Raman-Spektroskopie gibt es bereits tragbare, einfach zu bedienende Geräte, die auch für den Einsatz an vorderster Front, z.B. beim Zoll, geeignet sind. Der Referent erläuterte, dass NIR-Spektren im Gegensatz zu den Raman-Spektren nicht direkt auswertbar sind, so dass der Einsatz der Chemometrie unerlässlich ist. Ein großer Vorteil beider Techniken ist die Möglichkeit, sie bei Inprozesskontrollen einzusetzen (NIR quantitativ, Raman qualitativ), was sie für die Eingangskontrolle

und die Fälschungsanalytik interessant macht, vor allem da eine Messung durch das Primärpackmittel hindurch möglich ist.

Dr. Andreas Mayrhofer von der österreichischen Arzneimittelagentur AGES PharmMed in Wien ging auf die Problematik der Analyse illegaler Arzneimittel ein, welche als Arzneimittelfälschungen etwa 15% des Weltmarktes ausmachen. Auch auf diesem Gebiet wird zunehmend die Massenspektrometrie in Kopplung mit der HPLC oder GC eingesetzt, beispielsweise bei der Analyse von PDE₅-Hemmern wie Sildenafil und dessen Analoga oder auch der Designerdroge „Spice“, welche synthetische Cannabinoide enthält. Mayrhofer zeigte auch, dass Kriminelle die Patentliteratur als Goldgrube für die Entwicklung immer neuer Designerdrogen nutzen. Da deren Wirkung und Toxizität völlig unbekannt sind, ist das Risiko für den Konsumenten enorm hoch.

Die neue Software BioEquality wurde von Dr. Steven Watt von A&M STABTEST aus Bergheim vorgestellt. Diese wird zur umfassenden Analytik von Daten aus der Stabilitätsprüfung von Biopharmazeutika und für Komparabilitätsstudien von generischen Biopharmazeutika, den Biosimilars, entwickelt. Mit dieser Software können Daten aus verschiedensten Analysentechniken gesammelt werden, um z.B. Trendanalysen während einer laufenden Stabilitätsstudie anzufertigen oder um verschiedene Chargen miteinander zu vergleichen. Mit diesen Daten können zukünftig mögliche Laufzeiten abgeleitet, die Qualität des Produktionsprozesses überprüft und die Vergleichbarkeit eines Biosimilars mit dem Originator dargestellt werden. Darüber hinaus kann BioEquality von der MassMap Software ausgewertete Peptide MassMap Daten speichern, um eine semiquantitative Auswertung dieser durchzuführen. Damit wird eine umfassende Auswertung aller qualitätsrelevanten Daten für Biopharmazeutika ermöglicht.

Dr. Christian Hunzinger von Merck Serono in Darmstadt stellte alternative Analysemethoden zur Prozessqualitäts- und Produktkontrolle vor, nachdem er auf die Besonderheiten eines klassischen monoklonalen Antikörper-Herstellungsprozesses hingewiesen hatte. Beispielsweise kann als Alternative zur Protein-A-Affinitätschromatographie eine IgG-Quantifizierung mittels eines Gyrolab HT-ELISA durchgeführt werden, welcher über vergleichbare Reproduzierbarkeit und Selektivität verfügt, aber einen deutlich höheren Probendurchsatz ermöglicht. Auch die Kapillargelelektrophorese kommt vermehrt zur Analyse des IgG N-Glycan Fingerprints zum Einsatz - die hohe Präzision, sowie die Möglichkeit der Parallelanalyse (bis zu 384 Kapillaren pro Lauf) wurden besonders betont.

Die Möglichkeit der Proteinquantifizierung mit Hilfe der HPLC präsentierte Sandra Grotefend aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Hermann Wätzig von der Technischen Universität Braunschweig. Es wurden verschiedene Trennmechanismen (SEC, SAX, WCX, RP) vorgestellt und miteinander verglichen. Die Leistungsfähigkeit der einzelnen Methoden wurde detailliert untersucht und gezeigt, dass auf Grund der hohen Präzision bei guter Selektivität der Einsatz dieser Methoden für die Qualitätskontrolle von Biologicals sehr vorteilhaft ist, was auch Herr Dr. Hunzinger bestätigen konnte.

In ihrem Vortrag über die Analyse von Proteinen mit der Kapillargelelektrophorese stellte Claudia Cianciulli, wiederum aus dem Arbeitskreis Wätzig von der TU Braunschweig, fabelhafte Präzisionswerte für die Quantifizierung vor. Zwei Punkte wurden besonders hervorgehoben: Bei der Kapillargelelektrophorese ist es im Gegensatz zu Vorläuferarbeiten von Vorteil, hydrodynamisch zu injizieren und sehr wichtig für die guten Präzisionswerte ist die Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses auf über 100. Der Zusammenhang dieser Parameter wurde erstmals von Veronika

Meyer auf der Konferenz HPLC 2011 in Budapest detailliert beschrieben. Die Selektivität der Methode wurde am Beispiel der Untersuchung eines Antikörpers verdeutlicht.

Die Biological Interaction Analysis, kurz BIAcore, war das Thema von Dr. Isam Rais von Boehringer Ingelheim aus Biberach. Mit Hilfe der Biacore-Analytik ist es möglich, Interaktionen zwischen Antikörpern und seinen Liganden hinsichtlich der Kinetik und Affinität genau zu untersuchen. Die Technik kann auf Grund ihrer guten Präzision und Richtigkeit für die Qualitätskontrolle und in der Entwicklung von Biopharmazeutika eingesetzt werden. Es konnte eine sehr schnelle und robuste Methode zur Quantifizierung von Antikörpern entwickelt und validiert werden, welche auf Grund der Präzision und Automatisierbarkeit gegenüber ELISA Vorteile besitzt und vergleichbar mit der HPLC ist.

Die Herausforderungen bei der Bioanalytik von Metallkomplexen wurden von Prof. Dr. Ingo Ott, Technische Universität Braunschweig, diskutiert. Hierbei wurden AAS, ICP und XRF als mögliche Methoden vorgestellt und miteinander verglichen. Besondere Schwierigkeiten gibt es bei Proben biologischen Ursprungs jeweils auf Grund der vorliegenden Matrices. Beispielsweise führen hohe Salzkonzentrationen oft zu erheblichen Interferenzen. Instrumentelle Neuerungen stellen die *High Resolution Continuum Source AAS* (HR-CS AAS) und die *Total Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry* (TXRF Spektrometrie) dar. Bei der HR-CS-AAS wird anstelle der üblichen Hohlkathodenlampe (Linienstrahler) eine Xenon-Kurzbogenlampe (Kontinuumstrahler) als Strahlungsquelle verwendet. Dadurch kann eine deutlich verbesserte Untergrundkorrektur erreicht werden. Die TXRF Spektrometrie ermöglicht eine gleichzeitige quali- und quantitative Multielementanalyse.

Prof. Dr. Michael Karas von der Johann Wolfgang Goethe Universität aus Frankfurt, bekannt als Mitbegründer der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, die ansonsten eher für die Analytik großer Moleküle prädestiniert ist, zeigte in seinem Vortrag, dass die Technik trotz unvermeidlicher Matrixsignale auch für kleine Moleküle geeignet ist, wobei eine angepasste, gleichmäßige Probenpräparation eine zentrale Rolle spielt. Beispielhaft wurde von seiner Arbeitsgruppe eine Methode zur Quantifizierung von Acetylcholin und Cholin entwickelt. Diese zeigt gute Linearität, Präzision und Richtigkeit. Zwar ist im Gegensatz zum Elektrospray keine Online-Kopplung an die HPLC möglich, doch ist diese wegen geringerer Signalunterdrückungseffekte oftmals auch nicht nötig.

Der führende Toxikologe Prof. Dr. Dr. h.c. Hans H. Maurer von der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar) stellte die unverzichtbare Rolle der Massenspektrometrie bei klinischen und forensischen Untersuchungen dar. Das Screening nach unbekanntem Substanzen stellt dabei eine weit größere Herausforderung dar als eine zielgerichtete Target-Analyse. Die MS gibt der Forensik verbesserte Möglichkeiten, Suchtpatienten zu kontrollieren und Vergiftungen aufzuklären. Des Weiteren wurde noch ein „dilute and shoot“-Verfahren vorgestellt, welches die direkte Analyse von Urin mit Hilfe der LC-MS/MS ermöglicht.

Zu Beginn des zweiten Tages referierte Prof. Dr. Gérard Hopfgartner von der Universität Genf über das Zusammenspiel von hochauflösender Chromatographie und schneller Massenspektrometrie für simultane qualitativ-quantitative Analysen. Bei der etablierten informationsabhängigen Datenaufnahme (IDA) wird ein Peak im LC/MS unter bestimmten Kriterien erkannt und automatisch ein MS/MS-Fragmentspektrum aufgenommen. Hierbei können jedoch wertvolle Informationen fehlen. Bei neueren Ansätzen wie MS^E, Global Precursor Scan oder der Aufnahme von sequentiellen Fenstern (SWATH) wird hingegen praktisch ein komplettes MS- und MS/MS-Bild in einem einzigen Lauf generiert. Hier kommt es auf bioinformatische Werkzeuge an, um die wichtigen Informationen

zu gewinnen. Hopfgartner machte auch noch einmal deutlich, dass nicht einzelne Innovationen, sondern gerade die Kombination von hochauflösender Chromatographie (UHPLC), hochauflösender Massenspektrometrie und Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) eine neue Qualität bedeutet.

Dr. Christian Schmelzer von der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg gab „Molekulare Einblicke in die Alterung elastischer Fasern“, die in verschiedenen Bindegeweben, v.a. aber in der Haut vorkommen. Das hydrophobe und stark quervernetzte Strukturprotein Elastin ist praktisch unlöslich und gegenüber fast allen proteolytischen Enzymen stabil, was seine Untersuchung beträchtlich erschwert. Dennoch gelang es in der Arbeitsgruppe von Prof. Neubert am Institut für Pharmazie umfassende Strukturinformationen zu erlangen und die mit der Hautalterung verbundenen Veränderungen – die auch in eindrucksvollen elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen waren – mit molekularen Veränderungen am Elastin zu unterlegen. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse ist die Voraussetzung, um später gezielte Therapien zu entwickeln.

Die Leistungsfähigkeit der Kombination der Massenspektrometrie mit der Bildgebung erläuterte Dr. Markus Stöckli von der Novartis AG in Basel. Er hat sich auf die Technik des MALDI Imaging spezialisiert, bei dem mit der Kryomikrotom-Technik gewonnene Gewebeschnitte abgerastert werden. Bei der Entwicklung neuer Arzneimittel kann hierdurch sehr anschaulich gezeigt werden, in welchen Organen sich die jeweiligen Substanzen anreichern. Stöckli zeigte Aufnahmen eines „gläsernen Labors“, in dem die Probenpräparation und massenspektrometrische Untersuchung weitestgehend automatisiert erfolgt. Zwar hat die Technik insbesondere in der quantitativen Auswertung auch ihre Grenzen, hat sich jedoch für die Arzneimittelentwicklung als nützliches Werkzeug erwiesen.

Karl Mechtler aus dem Forschungsinstitut für Molekulare Pathologie Wien stellte in seinem Vortrag die Affinitätschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie als geeignetes Werkzeug für Proteomanalysen vor, vor allem für die zur Mitose nötigen Proteine. Nach Knock-Out-Experimenten konnte seine Arbeitsgruppe die Stöchiometrie von Proteinkomplexen durch eine LC-MS/MS-Methode zur absoluten Quantifizierung bestimmen. Dazu werden spezielle isotopisch markierte Peptide als interner Standard verwendet. Weitere Informationen können auf www.mitocheck.org erhalten werden.

Insgesamt bot die Tagung der Fachgruppe Arzneimittelkontrolle/Pharmazeutische Analytik viele informative Einblicke, insbesondere auf das sich weiter schnell entwickelnde Gebiet der Massenspektrometrie, sowie eine Übersicht über weitere interessante Themengebiete. Wie schon in den Vorjahren regten die niveaureichen Vorträge zu konstruktiven Diskussionen und intensivem fachlichen Austausch an. Die Organisatoren konnten sich über eine rege Teilnahme aus Universitäten, Industrie, Behörden und Auftragslabors freuen. **Auf der Internetseite der Fachgruppe (www.pharmchem.tu-bs.de/forschung/waetzig/dphg/#veranstaltungen) werden die meisten Vortragsfolien zugänglich gemacht.**

Im Rahmen der Fachgruppentagung fand auch die diesjährige Mitgliederversammlung statt, bei der der Vorstand, bestehend aus Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig und Privatdozent Dr. Klaus Raith, entlastet und für die nächste Amtsperiode von vier Jahren einstimmig wieder gewählt wurde. Frau Apothekerin Sandra Grotfend erklärte sich nochmals bereit, die Schriftführung zu übernehmen.

Die nächste Jahrestagung der Fachgruppe Arzneimittelkontrolle wird voraussichtlich am 09. und 10. Oktober 2012 in Greifswald stattfinden, in Anlehnung an die Jahrestagung der DPhG.

Näheres zur nächsten Fachgruppentagung bei Daniela Grimm, TU Braunschweig
(d.grimm@tu-bs.de).